

超声波预处理的人血小板冻干保存实验

范菊莉^{1,2} 张绍志² 徐梦洁² 许先国³ 陈光明²

(1. 南京航空航天大学航空宇航学院, 南京, 210016;

2. 浙江大学制冷与低温研究所, 杭州, 310027; 3. 浙江省血液中心, 杭州, 310006)

摘要: 在热孵化的基础上增加超声波辐射以强化海藻糖载入血小板, 将处理后的血小板进行冷冻干燥保存, 以未经超声波辐射仅受热孵化预处理的血小板为对照组, 研究超声波预处理对人血小板冻干保存的影响。结果表明, 经 25 kHz, 0.8 W/cm² 的超声波辐射 30 min 的血小板细胞内海藻糖浓度达到 (28.9 ± 4.48) mmol/L, 比对照组提高 118.9%, 超声处理后样品经血液学检测各项指标均为正常。两组血小板同时进行冻干后复水, 经检验, 样品组冻干血小板数值恢复率为 (83.3 ± 4.88)%, 血小板分布宽度值 (Platelet distribution width, PDW) 为 (18.9 ± 1.55)%; 对照组血小板数值恢复率为 (80.8 ± 4.54)%, PDW 值为 (18.1 ± 1.15)%, 两者不存在统计学差异。据此实验结果可以认为, 超声波载糖法用于血小板冻干预处理是可行的, 这为进一步进行血小板冻干研究提供了参考。

关键词: 人血小板; 超声波; 预处理; 海藻糖; 冻干

中图分类号: TB66, R331.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-2615(2012)03-0420-05

Experimental Study on Lyophilization Preservation of Human Platelets Pretreated by Ultrasound

Fan Juli^{1,2}, Zhang Shaozhi², Xu Mengjie², Xu Xianguo³, Chen Guangming²

(1. College of Aerospace Engineering, Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, Nanjing, 210016, China;

2. Institute of Refrigeration and Cryogenics, Zhejiang University, Hangzhou, 310027, China;

3. Blood Center of Zhejiang Province, Hangzhou, 310006, China)

Abstract: Trehalose can be loaded into platelets cells by heat incubation, and ultrasound is employed to enhance the loading of trehalose into human platelets. Then treated platelets are freeze-dried and rehydrated. The influence of the pre-treatment of ultrasound radiation on lyophilized platelets are studied, and the platelets only subjected to heat incubation are used as the controls. The results show that the intracellular trahalose concentration is (28.9 ± 4.48) mmol/L after radiation for 30 min by ultrasound (frequency of 25 kHz, intensity of 0.8 W/cm²). This concentration value is 118.9% higher than that of the controls. And the treated platelets show normal characteristics by several hematology examination. After freeze-drying and rehydration, the recovery of the freeze-dried samples is (83.3 ± 4.88)%, PDW is (18.9 ± 1.55)%, while for the control ones, the recovery and the PDW are (80.8 ± 4.54)% and (18.1 ± 1.15)%, respectively. There is no significant differences. Based on the experimental results, the ultrasound used as a pre-treatment of platelets lyophilization is feasible.

Key words: human platelets; ultrasound; pretreating; trehalose; lyophilization

基金项目: 国家自然科学基金(51106074)资助项目; 中国博士后科学基金(2011M501227)资助项目; 南京航空航天大学科研启动基金(1001-909382)资助项目; 中国科学院低温工程重点实验室开放基金(CRYO201123)资助项目。

收稿日期: 2011-05-31; **修订日期:** 2011-08-23

通讯作者: 范菊莉, 女, 博士, 副教授, 1981 年出生, E-mail: fjl@nuaa.edu.cn。

近年来,在生物材料低温保存和冻干保存的研究中,保护剂系统的研究一直备受关注。在细胞冻干前,需要对其进行预处理,以实现保护剂系统的加载。Wolkers 和 Tang 等人利用热孵化法对血小板进行预处理,将冻干保护剂海藻糖载入细胞内部,成功实现了血小板的冻干保存^[1-2]。2005年, Han 等在进行人红细胞冻干保存前,将其置于葡萄糖和 PBS 的缓冲液中进行预处理,以实现保护剂的加载,冻干复水后细胞恢复率大于 80%^[3]。2006年,卢发强等人对人血小板冻干保存前胞内海藻糖负载技术进行了研究,筛选出最佳负载海藻糖试验条件为 37 °C, 孵化 4 h^[4]。2007年, Sum 和 Pietramaggiore 等在进行血小板冻干研究时,将血小板置于含海藻糖的缓冲液中进行预处理,他们对冻干后血小板治愈伤口的特性进行了验证^[5-6]。2007年, Zhou 等采用热孵化的方式加载保护剂,研究了不同的糖类保护剂对血小板冻干的影响^[7]。2008年,刘景汉等在兔血小板冻干保存前,添加血小板可逆性激活抑制剂、海藻糖和二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)冻干后的兔血小板具有较好的聚集活性和体内存活率^[8]。2010年,姚根宏等人研究了不同浓度海藻糖和葡萄糖在 37 °C 联合负载红细胞 6 h 后的实验效果,为冷冻干燥红细胞提供新的保护剂^[9]。

普遍认为,海藻糖在细胞内外都存在的情况下保护作用较好^[10]。海藻糖作为一种非渗透性的冻干保护剂,如何将其载入细胞内部已成为研究的难点之一。目前已经提出的将海藻糖载入哺乳动物细胞内的试验方法主要有:热孵化、利用化学物质改变膜渗透性、基因法、电穿孔、显微注射等^[11]。作者所在课题组 Zhang 等在 2009 年提出利用超声波强化海藻糖载入血小板的试验方法^[12],并对不同频率和强度的超声波进行了试验。超声波^[13]是一种物理的而非化学的、非侵入性的、非扩散性的且无毒的方法,它特别适用于细胞和药物^[14]。该方法的实质在于超声波的生物医学效应,即一定能量的超声波可引起生物体系的功能或结构发生变化,这种效应对于生物体的作用可分为可逆和不可逆两种^[15]。为了研究超声波强化载糖处理对血小板冻干保存的影响,本文在前期试验的基础上,以 37 °C 水浴热孵化 4 h 并施加 25 kHz, 0.8 W/cm² 超声波辐射 30 min 强化载糖预处理的血小板为样品进行冻干保存,以未经超声波辐射仅 4 h 热孵化载糖预处理的血小板为对照组,以期验证超声波预处理载糖应用于人血小板冻干保存的可行性,并为血小板

冻干保存的进一步研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 溶液配制

孵化保护液含 50 mmol/L 海藻糖(C₁₀H₂₂O₁₁ · 2H₂O, 北京经科宏达生物技术有限公司), 100 mmol/L 氯化钠(NaCl), 10 mmol/L 氯化钾(KCl), 10 mmol/L 乙二醇双乙胺醚-N,N'-四乙酸(EGTA), 10 mmol/L 咪唑。

冻干缓冲液含 9.5 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 142.5 mmol/L NaCl, 4.8 mmol/L KCl, 1 mmol/L 氯化镁(MgCl₂)。以冻干缓冲液为基准液,添加 1% 牛血清白蛋白(BSA, 上海生工)和 20% 海藻糖作为细胞外保护剂,浓度百分比以 g/100mL 表示,配置成血小板冻干保护液备用。

1.2 血小板预处理

实验用新鲜浓缩血小板[(1~1.5) × 10⁹ 个/ml]由浙江省血液中心提供,来自健康无偿献血者。首先将富含血小板的血浆以 480g 离心 15 min,使血小板沉淀,弃去上层血浆。然后加适量生理盐水重悬,再以 480 g 离心 10 min 收集血小板,重复洗涤 3 次。洗涤后的血小板用孵化保护液配制成浓度约 1 × 10⁹ 个/mL 的血小板孵化悬浮液备用。

1.3 血小板载糖试验

将上述血小板孵化悬浮液置于 37 °C 的恒温水浴中孵化 4 h,同时对样品施加超声波辐射以达到强化海藻糖载入血小板的目的。为防止血小板聚集,孵化时每隔半小时振荡样品。实验装置如图 1 所示。试验用超声波发生器为工作频率 25 kHz 的 CGT 系列超声波清洗机的改装装置(港威超声电子有限公司,张家港,中国),最大发射功率为 80 W,采用连续正弦波,辐射面直径 6 cm,面积 28.27 cm²。血小板孵化悬浮液装入特制的有机玻璃容器

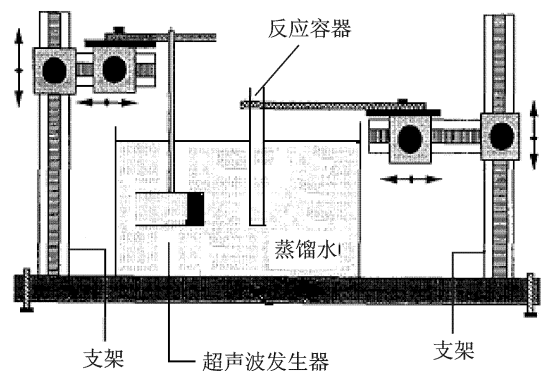


图 1 实验装置示意图

中^[12]。样品溶液充满容器底部圆柱形空间,其圆柱形截面与超声波传播方向垂直,从而保证样品溶液在超声波传播方向上受到的辐射保持稳定一致。

作者所在课题组曾对超声波辐射强度(空化阈值范围附近0.4,0.8和1.2 W/cm² 3种强度)及时间(5,10,15,30 min,1,2 h)进行了双因素试验研究,以无超声波辐射仅在37 °C孵化4 h的血小板样品为对照组。试验结果表明:经25 kHz,0.4 W/cm²或0.8 W/cm²超声波辐射30 min或1 h并同时孵化4 h处理后的血小板细胞内海藻糖含量比无超声波辐射的对照组明显增加^[12]。

本文采取25 kHz,0.8 W/cm²的超声波辐射30 min,并伴随37 °C孵化4 h,作为冻干前海藻糖载入血小板的预处理方案。

1.4 海藻糖含量的检测

载糖处理后的部分血小板样品用于细胞内海藻糖含量的检测。将样品溶液用生理盐水洗涤(480g离心10 min),以排除细胞外残留的未载入的海藻糖,重复洗涤3次后重悬于生理盐水中。用CELL-DYN1700型血球计数仪(Abbott,美国)进行血小板计数及平均体积检测。血小板细胞内海藻糖用80%的甲醇溶液萃取,并采用蒽酮硫酸法^[16]测定细胞内海藻糖含量。

蒽酮硫酸法是由于糖类在高温下受硫酸作用而脱水,生成糠醛或糠醛衍生物,再与蒽酮反应后生成蓝绿色化合物,生成物颜色的深浅反映了样品含糖量的多少。根据该原理,利用分光光度计对蒽酮硫酸处理后的样品进行比色对照,制定海藻糖浓度的标准曲线,将样品比色结果与标准曲线对照,即可计算出待测液中的海藻糖含量。由于蒽酮硫酸法也可以检测到海藻糖以外的其他糖类,因此,每次试验平行处理未经海藻糖孵化的血小板,将其值从中减去,避免血小板内其他糖类对细胞内海藻糖检测计算的影响。每次试验均绘制新的海藻糖标准曲线,以减小环境变化引起的误差。

假设血小板内细胞液占血小板总体积的50%^[17],根据待测液中海藻糖的浓度和被测血小板的总体积,血小板内海藻糖浓度的计算公式为

$$C_t = \frac{aC/M}{vNV/2} \quad (1)$$

式中: C_t 单位为mmol/L; a 为待测液体积, $a=3$ mL; C 为由海藻糖标准曲线得到的待测液中海藻糖的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; M 为海藻糖摩尔质量, $M=378.33$ g/mol; v 为测细胞内海藻糖浓度所取的血小板悬液的体积, $v=1$ mL; N 为由血球计数

仪得到的血小板浓度(个/L); V 为由血球计数仪得到的血小板平均体积 μL 。

1.5 血小板冷冻干燥

载糖处理后的血小板细胞经洗涤后用血小板冻干保护液重悬,调整细胞浓度至 1×10^9 个/mL左右。取1 mL血小板冻干悬浮液装入直径为25 mm的玻璃瓶中,放入-60 °C低温冰箱(Thermoforma,美国)冷冻2 h,将完全冻结的血小板样品迅速取出,置于FreeZone^{12 plus}型冻干机(LabConco,美国)的干燥箱内搁板上,冷冻干燥箱搁板预先冷却至-40 °C,冷阱预冷至-80 °C。加载样品后对冻干箱进行抽真空,整个干燥过程中冻干箱内真空度维持在1 Pa左右。一次干燥开始,搁板温度控制在-40 °C,持续20 h;然后搁板温度以0.2 °C/min升温至20 °C,开始二次干燥,持续约10 h以上。冻干结束利用自动压盖系统将血小板玻璃样品瓶用橡皮塞密封。

1.6 血小板血液学分析

冻干后的血小板样品在25 °C室温下用50%血浆溶液(体积比)直接复水。用CELL-DYN1700型血球计数仪(Abbott,美国)对冻干前及复水后的血小板溶液进行计数,并测定其血小板分布宽度(Platelet distribution width, PDW)。冻干复水后血小板恢复率 R_p 为到

$$R_p = \frac{N_a}{N_b} \times 100\% \quad (2)$$

式中: N_a 表示冻干复水后的血小板计数, N_b 表示冻干前血小板计数。

1.7 统计学分析

为使试验数据具有生物统计学意义,每组试验平行处理4组样品,并重复实验4次。试验数据采用双尾 t 检验法^[18]进行统计学分析,以 $P \leq 0.05$ 为统计学显著性差异标准。

2 结果与讨论

2.1 海藻糖的载入量

在37 °C水浴中孵化4 h,同时经频率为25 kHz,强度为0.8 W/cm²的超声波处理30 min的血小板样品,其细胞内海藻糖浓度达到 (28.9 ± 4.48) mmol/L,以不施加超声波辐射的样品为对照组,其细胞内海藻糖浓度为 (13.2 ± 1.27) mmol/L,两者相比,超声波辐射组细胞内海藻糖浓度比对照组提高了118.9%。经统计学分析,两者存在显著性差异, $P=0.01 \leq 0.05$ 。

2.2 超声波处理对冻干血小板的影响

以经频率为25 kHz,强度为0.8 W/cm²的超声

波处理 30 min 并经 4 h 孵化的部分血小板为样品, 仅以孵化的血小板为对照组。表 1 为孵化后血小板的数值减少率及平均体积 (Mean platelet volume, MPV) 膨胀率。由表 1 可以看出, 经 25 kHz, 0.8 W/cm² 的超声波辐射 30 min 并孵化 4 h 后的血小板数值减少率及 MPV 膨胀率与仅孵化的血小板无显著性差异。图 2 为血小板尺寸分布宽度曲线, 图 2 (a~c) 分别表示孵化前血小板、4 h 孵化处理后的血小板和经 30 min 超声波 (频率 $f=25$ kHz, 强度 $I=0.8$ W/cm²) 辐射并 4 h 孵化的血小板。由图 2 可以看出, 孵化后的血小板尺寸分布比孵化前血小板尺寸分布略宽, 但仍较为集中, 说明孵化对血小板尺寸分布宽度影响极小, 而且, 经超声波辐射的血小板与不加超声波辐射仅孵化的血小板相比, 其尺寸分布宽度曲线基本相同, 这表明 30 min 超声波 ($f=25$ kHz, $I=0.8$ W/cm²) 辐射对血小板尺寸分布宽度基本无影响。

表 1 血小板数值减少率及 MPV 膨胀率 %

组别	血小板数值减少率	MPV 膨胀率
超声波处理组	9.1±2.41	6.5±0.98
对照组	8.0±0.98	6.3±1.94

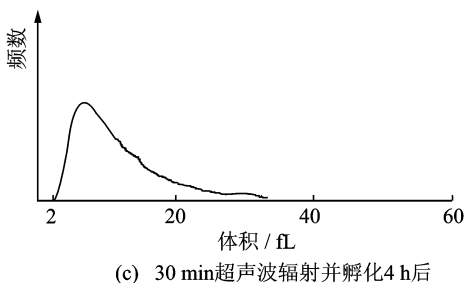
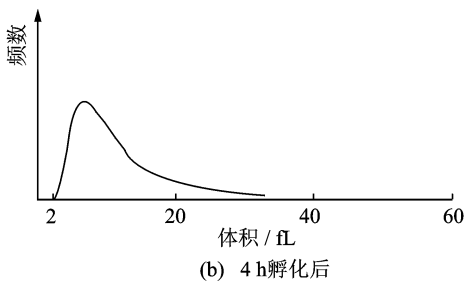
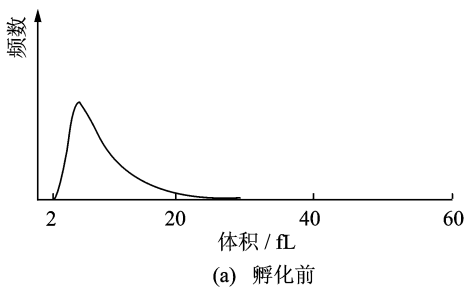


图 2 血小板尺寸分布曲线

两组样品经扫描电子显微镜观察, 细胞保持结构完整, 形态上不存在显著性差异^[12]。经流式细胞术^[19]分析, 样品组细胞非活化的血小板达到 89.9%, 这表明, 25 kHz, 强度为 0.8 W/cm² 的超声波处理 30 min 并经过 4 h 的孵化处理对血小板的生物学特性基本没有影响。

将两组血小板进行冻干保存, 复水后, 对其进行血液学分析。表 2 给出了冻干复水后血小板的数值恢复率及血小板分布宽度值 (Platelet distribution width, PDW)。由表 2 可以看出, 经 25 kHz, 0.8 W/cm² 的超声波辐射 30 min 并孵化 4 h 后冻干复水的水小板数值恢复率及 PDW 值与对照组无显著性差异, $P \leq 0.05$ 。新鲜血小板的 PDW 范围为 15.5% ~ 18.1%, 两组血小板的 PDW 值均在正常范围内。

表 2 冻干血小板数值恢复率及 PDW 值

组别	血小板数值恢复率/%	PDW/%
超声波处理组	83.3±4.88	18.9±1.55
对照组	80.8±4.54	18.1±1.15

3 结 论

普遍观点认为, 超声波的生物效应中最重要的就是超声空化效应^[20]。气穴的形成和破裂是超声波影响细胞膜渗透性的主要原因。超声波的空化作用可能导致空泡周围细胞的质膜击穿或透性改变, 这种改变如果可逆, 细胞自身能修复膜的破损, 便能提高细胞膜的通透性, 且不影响细胞的生物活性。

本文利用超声波法强化海藻糖载入血小板, 试验表明, 在超声波的作用下, 血小板细胞膜的渗透性能发生改变, 利用这一改变能强化将海藻糖等非渗透性保护剂载入血小板细胞内部。在超声波频率 25 kHz、强度 0.8 W/cm²、辐射时间 30 min 的条件下细胞内海藻糖的载入量仅比孵化组提高了 118.9%。并且, 该超声波作用对血小板细胞的形态结构及生物特性几乎不存在影响。

对载糖处理后的人血小板进行冻干保存实验研究, 比较了经超声波强化载糖处理后的血小板以及仅以热孵化方法载糖处理的水小板的冻干效果。结果表明, 两组血小板均能成功实现冻干, 冻干复水后细胞恢复率达到 80% 以上, 血小板血液学指标也在正常范围内, 两组细胞的冻干效果经生物统计学分析, 不存在显著性差异。这说明, 超声波载糖法

用于冻干血小板的预处理是可行的。尽管实验的超声波强化处理方法明显提高了海藻糖对血小板的载入量,但是,该处理后的胞内保护剂浓度的增加,并未显著提高血小板的冷冻干燥保存效果。分析认为,这可能是由于冻干前血小板细胞内保护剂海藻糖的浓度存在一个最佳值,而并不是保护剂浓度越高越好。本文研究表明,超声波载糖法用于血小板冻干预处理是可行的,这为血小板冻干保存的深入研究提供了参考。

参考文献:

- [1] Wolkers W F, Walker N J, Tamari Y, et al. Towards a clinical application of freeze-dried human platelets[J]. *Cell Preservation Technology*, 2002, 1(3):175-188.
- [2] Tang M, Wolkers W F, Crowe J H, et al. Freeze-dried rehydrated human blood platelets regulate intracellular pH. [J]. *Transfusion*, 2006, 46(6):1029-1037.
- [3] Han Y, Quan G B, Liu X Z, et al. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization. [J]. *Cryobiology*, 2005, 51(2):152-164.
- [4] 卢发强,刘景汉,欧阳锡林,等. 人血小板冻干前预处理技术的实验研究[J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(5):599-601.
Lu Faqiang, Liu Jinghan, Ouyang Xilin, et al. Experimental study on the pretreatment technology of human platelets[J]. *Journal of Chinese Physician*, 2006, 8(5):599-601.
- [5] Sum R, Hager S, Pietramaggiore G, et al. Wound-healing properties of trehalose-stabilized freeze-dried outdated platelets[J]. *Transfusion*, 2007, 47(4):672-679.
- [6] Pietramaggiore G, Kaipainen A, Ho D, et al. Trehalose lyophilized platelets for wound healing[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2007, 15(2):213-220.
- [7] Zhou X L, Zhu H, Zhang S Z, et al. Freeze-drying of human platelets: Influence of saccharide, freezing rate and cell concentration[J]. *Cryoletters*, 2007, 28(3):187-196.
- [8] 刘景汉,张长虹,周俊. 冷冻干燥保存兔血小板的实验研究[J]. *中国输血杂志*, 2008, 21(9):663-665.
Liu Jinghan, Zhang Changhong, Zhou Jun. Experimental study on lyophilization of platelets[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2008, 21(9):663-665.
- [9] 姚根宏,栾建凤,叶东. 海藻糖和葡萄糖联合负载红细胞的效果评价[J]. *临床输血与检验*, 2010, 12(1):4-6
Yao Genghong, Luan Jianfeng, Ye Dong, et al. The effect of red blood cells loaded with combination of trehalose and glucose[J]. *J Clin Transfus Lab Med*, 2010, 12(1):4-6.
- [10] Wolkers W F, Walker N J, Tablin F, et al. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying[J]. *Cryobiology*, 2001, 42(2):79-87.
- [11] Fuller B J, Benson E E, Lane N. Life in the frozen state[M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [12] Zhang S Z, Fan J L, Xu X G, et al. An experimental study of the use of ultrasound to facilitate the loading of trehalose into platelets[J]. *Cryobiology*, 2009, 59(2):135-140.
- [13] Sundaram J, Mellein B R, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes[J]. *Biophysical Journal*, 2003, 84(5):3087-3101.
- [14] Paliwal S, Mitragotri S. Ultrasound-induced cavitation: applications in drug and gene delivery[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3(6):713-726.
- [15] Hassan M A, Feril Jr L B, Suzuki K, et al. Evaluation and comparison of three novel microbubbles: Enhancement of ultrasound-induced cell death and free radicals production[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2009, 16(3):372-378.
- [16] Umbreit W W, Burris R H, Stauffer J F. et al. *Manometric and biochemical Techniques* [M]. Minneapolis: Burgess, 1972.
- [17] Oliver A E, Jamil K, Crowe J H, et al. Loading human mesenchymal stem cells with trehalose by fluid-phase endocytosis[J]. *Cell Preservation Technology*, 2004, 2(1):35-49.
- [18] 李春喜,王志和,王文林. *生物统计学*[M]. 北京:科学出版社, 2000:149-153.
- [19] Michelson A D, Barnard M R, Krueger L A, et al. *Flow cytometry*[M]. New York: Academic/Elsevier Science, 2002:297-315.
- [20] Frulio Nora, Trillaud Hervé Deckers Roel, et al. Influence of ultrasound induced cavitation on magnetic resonance imaging contrast in the rat liver in the presence of macromolecular contrast agent[J]. *Investigative Radiology*, 2010, 45(5):282-287.